

柑橘低氧应答基因 *CsHRP* 的克隆、亚细胞定位及表达分析^①

陈 娇^{1,2,3}, 马岩岩³, 张 军³, 杨雪莲²,
钟广炎⁴, 朱世平³, 陆智明²

1. 富顺县农牧局 经济作物站, 四川 富顺 643200; 2. 西南大学 园艺园林学院, 重庆 400715;
3. 中国农业科学院 柑橘研究所, 重庆 400712; 4. 广东农业科学院 果树研究所, 广州 510640

摘要: 采用 RT-PCR 和 RACE 技术从奥林达夏橙 [*Citrus sinensis* (L.) cv. Olinda] 果萼离层中分离出 1 个低氧应答基因, 命名为 *CsHRP*. *CsHRP* 基因的序列分析推测其编码 98 个氨基酸残基. *CsHRP* 基因组序列与 cDNA 比对结果表明其含有 2 个内含子. Blastp 分析发现, *CsHRP* 含有保守的低氧应答保守结构域 HIG_1_N, 与可可、玉米、橡胶树等植物中的同源蛋白相似度达 68%~81%. 亚细胞定位显示 *CsHRP* 是细胞膜/细胞壁锚定蛋白. qRT-PCR 试验结果显示 *CsHRP* 在幼苗子叶中的表达量明显高于根、茎、叶. 在逆境处理条件下, *CsHRP* 表达受低温、高盐, PEG6000, 脱落酸, 乙烯, 甲基茉莉酸和水杨酸诱导, 说明该基因响应多种信号转导.

关键词: 柑橘; 低氧应答基因; 基因表达

中图分类号: S666

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2016)02-0037-07

土壤的水淹降低了植物根际 O_2 浓度, 形成低氧或无氧状态, 影响植物的正常生长发育和生理代谢^[1-3]. 事实上, 在空气中含氧量正常条件下植物也会遭受低氧胁迫, 这是由于植物组织细胞内的氧运输阻碍造成的^[4-5].

近年来就植物在低氧条件下的生理生化反应开展了深入研究, 随着分子生物学的发展和应用, 人们对于低氧胁迫的研究重点已转向功能基因的分析. 植物通过调控转录水平和翻译特异性基因来增加其对低氧环境的适应性^[6]. 目前, 相关低氧应答转录因子和低氧应答基因已被克隆研究^[7-9]. 植物中已报道的低氧应答相关转录因子有 MYC, MYB, AP2/ERF 和 NAC 家族成员^[10-13], 而植物中低氧应答基因的报道则相对较少. 低氧应答基因广泛存在于真核生物中, 在动物和细菌中研究比较深入, 低氧应答基因编码的氨基酸特点是在 N-端含有保守的 HIG_1_N 结构域, 该结构是潜在的跨膜区域^[14].

本试验通过 RT-PCR 和 RACE 技术从奥林达夏橙 [*Citrus sinensis* (L.) cv. Olinda] 果萼离层中获得了 1 个低氧应答基因, 命名为 *CsHRP*, 研究了该基因在不同外源激素和非生物胁迫下的表达模式, 并且还对该基因蛋白进行了亚细胞定位.

1 材料与方法

1.1 试验材料及处理

本试验采用的材料是 1 月龄奥林达夏橙无菌苗. 奥林达种子采自中国农科院柑桔研究所资源圃, 种子

① 收稿日期: 2014-12-02

基金项目: 重庆市科委 121 示范工程专项(cstc2014zktjcxxyBX0031); 农业部公益性行业(农业)科研专项(201203075-07).

作者简介: 陈 娇(1990-), 女, 四川宜宾人, 硕士研究生, 主要从事果树生理生态和采后生理的研究.

通信作者: 陆智明, 副教授, 硕士研究生导师.

先用 1 mol/L 的 NaOH 处理 30 min, 再用 3% 的次氯酸处理 30 min, 最后无菌水清洗 3~5 遍. 然后将消毒种子去除种皮播于 MS 培养基上, 在 28 ℃, 16 h 光照与 8 h 黑暗条件下生长 1 个月. 1 月之后将奥林达幼苗放入乙烯质量浓度为 20 mg/L 的密闭容器中(50L), 处理 4, 12, 24, 48 h; 分别用 100 μmol/L ABA, 2 mmol/L MeJA 和 100 μmol/L SA 处理幼苗 0, 2, 4, 8, 12 和 24 h; 将幼苗分别置于 4 ℃, 250 mmol/L NaCl, 20% 的 PEG6000 条件下处理 0, 2, 4, 8, 12 和 24 h; 每个处理重复 3 次. 于不同处理时间点收集材料并立即用液氮速冻, -80 ℃ 保存.

1.2 RNA, DNA 提取和 cDNA 合成

试验材料总 RNA 的提取使用天根公司试剂盒 RNAprep pure Kit. cDNA 的合成使用 Promega 公司的反转录试剂盒 Promega Reverse Transcription System. 柑橘叶片 DNA 的小量提取参照天根公司 Plant Genomic DNA Kit 说明书操作.

1.3 CsHRP 基因克隆与序列分析

根据前期获得的柑橘基因组芯片数据(Citrus Genome Array, Affymetrix), 找到 CsHRP 基因的探针号, 在 HarvEST Citrus1.25 EST 数据库中查找到相关 EST 序列, 再根据 EST 序列使用引物设计软件设计基因特异性引物 A1 和 A2(A1: TTCTGAACGACCCA CTCCTAACAGATT; A2: CCTCCTCGGAC-CTCATTCTCATTTCAGT)^[15], 最后通过 5' 和 3'RACE 技术获得该基因的全长, 试验操作按照 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 的说明书进行.

分别使用 BLASTp(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)和 Conserved Domains(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>)分析氨基酸序列的同源性和蛋白的保守结构域. 蛋白的相对分子量和等电点用 DNASTar 分析. MEGA5.1 用于多重序列的比对分析.

1.4 实时荧光定量分析

采用该基因特异引物 BF/BR (BF: CGGGTTCCATCGCCTACA; BR: CACCAGCAAGAGCAGC-CAGT)分析 CsHRP 基因表达模式, 以柑橘 ACTIN(ACTIN-F: CCCCATCGTTAC CGTCCAG; ACTIN-R: CGCCTTGCCAGTTGAATATCC)为内参基因. 使用 Bio-Rad CFX96TM 荧光定量 PCR 仪(Bio-RAD, USA)进行实时定量 PCR 检测, 具体操作按照 Promega GoTaq[®] qPCR Master Mix 进行, PCR 反应体系(20 μL)如下: Master Mix (2×) 10 μL, 正向引物(10 μmol / L)0.2 μL, 反向引物(10 μmol/L)0.2 μL, 总 cDNA 1 μL. PCR 反应程序为 95 ℃ 变性 2 min, 95 ℃ 10 s, 60 ℃ 60 s 循环 40 次. 通过溶解曲线检测引物是否可用. 按照公式($2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\Delta Ct = Ct_{\text{目标基因}} - Ct_{\text{内参基因}}$)进行数据分析. 设定未处理材料的数据(对照)为 1, 其他数据相对进行比较. 使用 SPSS 19.0 软件进行显著性分析.

1.5 亚细胞定位载体的构建和定位分析

根据 CsHRP 去除终止密码子的 ORF 序列分别设计含有 BamH I 和 Sam I 酶切位点的引物 DF/DR (DF: CATTCAGTTTTTCGTTTTCTTCTTTTTTCATCTT; DR: ATCCTTGTGTGCGTATGGAT-CAGCCG), 经过双酶切把该片段插入 pBI121 载体(含有报告基因 GFP)中, 构成融合表达载体(含有 35S-CsHRP-GFP), 再将构成的载体转入农杆菌 LBA4404. 蛋白定位方法根据 Sun 等^[16]对农杆菌介导洋葱表皮细胞瞬时表达的报道进行, 将已转入载体的农杆菌侵染洋葱表皮, 侵染之后将其置于 23 ℃ 条件下黑暗培养 36 h, 荧光蛋白的亚细胞定位使用荧光共聚焦显微镜进行观察.

2 结果与分析

2.1 奥林达果实离层 CsHRP 基因的克隆及序列分析

通过 RACE 获得 CsHRP 的 cDNA 全长为 795 bp, 开放阅读框为 297 bp, 预测可编码含 98 个氨基酸残基的多肽, 分子量为 10.84kD, 等电点为 9.60. 通过比对 cDNA 发现, 该基因的基因组序列含有 2 个内含子(图 1). CsHRP 蛋白二级结构预测显示 CsHRP 主要是由 2 个 α 螺旋(图 2), 3 个随机卷曲组成. Blastp 预测结构功能区发现, CsHRP 含有 1 个低氧诱导蛋白保守结构域(第 16 个氨基酸至第 67 个氨基酸区域), 2 个 N 端酰胺化位点(第 30 氨基酸至第 35 氨基酸, 第 43 氨基酸至第 48 氨基酸区域)和 2 个转膜结构域(第 20 氨基酸至第 40 氨基酸, 第 57 氨基酸至第 74 氨基酸区域). 从结构上预测 CsHRP 具有跨膜结

5'UTR 5'非翻译区 70 bp 105 bp 91 bp 119 bp 136 bp 3'UTR 3'非翻译区

外显子 内含子

Figure 1 is a schematic representation of the experimental design. It shows a horizontal timeline from day 1 to day 98. At day 1, a long black bar labeled 'I' indicates the start of the experiment. At day 28, a shorter black bar labeled 'II' indicates the start of the second experiment. At day 56, a shorter black bar labeled 'III' indicates the start of the third experiment. The timeline ends at day 98.

I: 低氧蛋白保守结构域(HIG 1 N); II: N-端肽激化位点(MYRISTYL); III: 跨膜区域; H: 螺旋结构; E: 延伸区域.

柑橘

橡胶树(ADR30790)

拟南芥(NP187206)

可可树(XP_007031016)

毛果杨(XP_006382469)

金雀花(EPS73421)

水稻(NP_001047293)

玉米(NP_001152359)

乌拉尔图小麦(EMS64814)

北美云杉(ABK21045)

21.3

20

15

10

5

0

Nucleotide Substitutions ($\times 100$)

2.2 CsHRP 蛋白的亚细胞定位

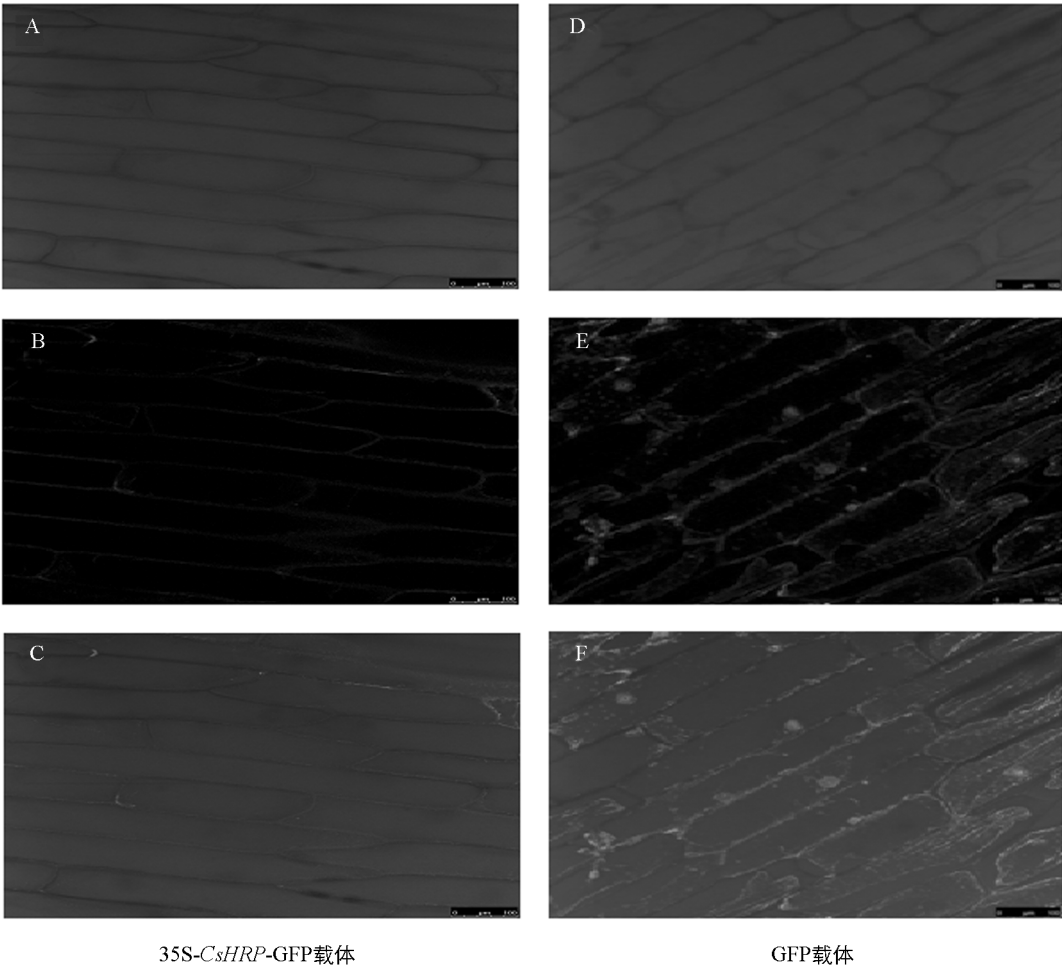
2.3 *CsHRP* 基因表达分析

CsHRP 基因在 1 月龄奥林达幼苗不同组织中的实时荧光定量 PCR 分析结果显示, *CsHRP* 在子叶中表达量最高, 而在根、茎、叶中的表达量低, 其中在茎中的表达量最低(图 5).

根据本试验前期芯片数据,在乙烯处理的果萼离层区 *CsHRP* 基因表达受强烈诱导.为进一步验证此结果,本试验用 20 mg/L 的乙烯处理奥林达幼苗,结果显示其在乙烯处理 12 h 时达到最高. *CsHRP* 基因在脱落酸(ABA),甲基茉莉酸(MeJA),水杨酸(SA)处理条件下强烈表达,且都在处理后 4 h 达到最高(图 6).

从图 7 可以看出,在脱水胁迫(20%PEG6000)下,*CsHRP* 表达在处理 2 h 时上升,此后变化呈波动状态,但都较对照更高;在 250 mmol/L 的 NaCl 处理下,*CsHRP* 的响应在 2 h 时明显上升,继而有所下降,并在处理 8 h 时达到最高,此后随处理时间而下降;在 4 °C 冷害胁迫下,*CsHRP* 表达在处理期间不

断上升，在 24 h 时达到最高.



A,D: 白光下洋葱表皮细胞图; B,E: 荧光显微镜下 *CsHRP*-GFP 蛋白, GFP 蛋白的绿色荧光信号; C: A 和 B 的重叠图像; F: D 与 E 的重叠图像.

图 4 *CsHRP* 和 GFP 在洋葱表皮细胞中的瞬时表达

3 讨 论

本试验从奥林达夏橙中克隆了低氧应答基因 *CsHRP* 的 cDNA 全长, 氨基酸序列分析显示其具有低氧应答基因 HIG_1_N 家族的保守结构, 该结构被认为是潜在的跨膜区域, *CsHRP* 蛋白定位在洋葱表皮细胞的细胞膜/细胞壁上也验证这一点. 进化分析显示 *CsHRP* 蛋白与双子叶植物橡胶树中低氧应答基因相似度最高, 达到 81%.

子叶是种子萌发及幼苗时期主要的能量来源, 也是需氧量最高的组织^[17]. qRT-PCR 分析 *CsHRP* 基因在幼苗的子叶中的表达量最高, 推测在柑橘生长过程中氧气供应量不充足时则形成了相对低氧状态, 而子叶的需氧量较大, 故而激发了该基因的大量表达, 而其他组织的需氧量相对较小, 所以 *CsHRP* 基因的表达量比子叶中该基因的表达量相对要低. 低氧应答基因的表达不仅参与发酵、糖代谢而且影响乙烯合成相关基因的表达^[18-19]. 前期芯片数据和 qRT-PCR 均显示 *CsHRP* 基因受乙烯的强烈诱导, 推测可能参与乙烯应答途径. 乙烯与茉莉酸(JA), 水杨酸(SA), 脱落酸(ABA)被认为是与植物生物胁迫最为密切的植物激素^[20-21], 它们的信号途径存在广泛的交叉反应^[20].

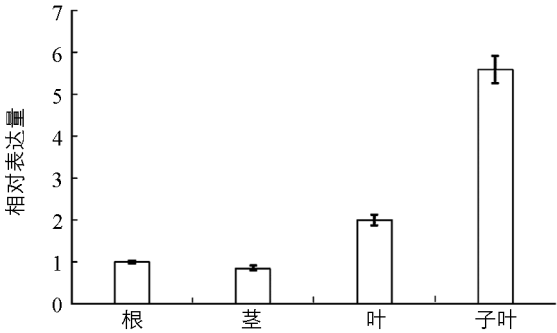
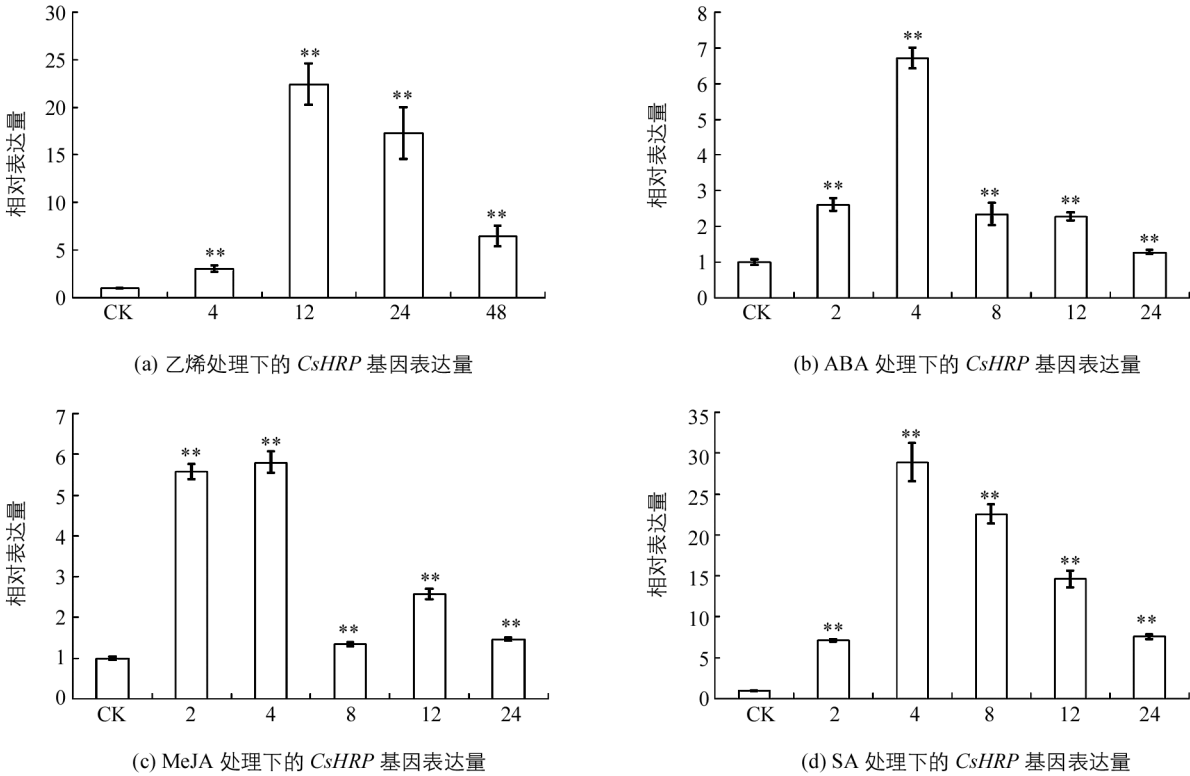


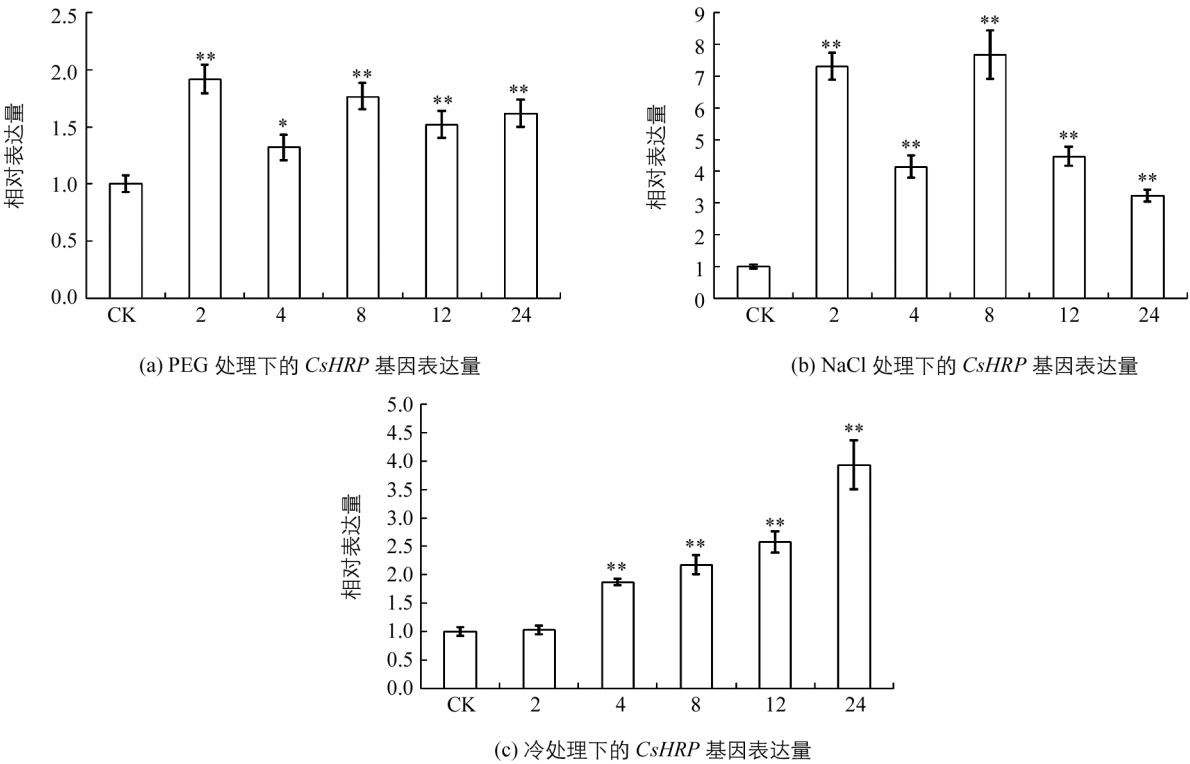
图 5 *CsHRP* 基因在不同组织中的相对表达量

在本试验分析中 *CsHRP* 基因受乙烯, SA, JA 和 ABA 等激素诱导强烈表达, 推测 *CsHRP* 基因参与了多重信号传导途径.



* 表示 $p<0.05$; ** 表示 $p<0.01$.

图 6 *CsHRP* 基因在不同外源激素处理下的表达量



* 表示 $p<0.05$; ** 表示 $p<0.01$.

图 7 非生物胁迫下 *CsHRP* 基因的相对表达量

植物是专性好氧性生物,当遇到水淹时就会造成氧气供应不足即低氧胁迫,植物体内具有相应的应答机制来应对各种生物和非生物胁迫. Muhammad 用淹水处理大麦时发现,气孔传导率、根的导水率和根部的耗氧量均增大,同时低氧应答基因表达量也升高,说明低氧应答基因可能起到增加植物抗胁迫能力的作用^[22-23]. 在试验中 *CsHRP* 基因受高盐、脱水和冷处理胁迫的诱导,说明 *CsHRP* 不仅响应低氧胁迫应答,而且对生物和非生物胁迫均有应答响应,推测其具有增强柑橘抗胁迫的能力.

参考文献:

- [1] DREW M C. Oxygen Deficiency and Root Metabolism: Injury and Acclimation Under Hypoxia and Anoxia [J]. Annual Review of Plant Biology, 1997, 48(1): 223—250.
- [2] KAWANO N, ITO O, SAKAGAMI J I. Relationship Between Shoot Elongation and Dry Matter Weight During Submergence in *Oryza sativa* L. and *O. glaberrima* Steud. Rice Cultivars [J]. Plant Production Science, 2008, 11(3): 316—323.
- [3] HUANG S, COLMER T D, MILLAR A H. Does Anoxia Tolerance Involve Altering the Energy Currency Towards PPi? [J]. Trends in Plant Science, 2008, 13(5): 221—227.
- [4] GEIGENBERGER P. Response of Plant Metabolism to Too Little Oxygen [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2003, 6(3): 247—256.
- [5] VAN DONGEN H P, BAYNARD M D, MAISLIN G, et al. Systematic Interindividual Differences in Neurobehavioral Impairment from Sleep Loss: Evidence of Trait-Like Differential Vulnerability [J]. Sleep, 2004, 27: 423—433.
- [6] LICAUSI F, PERATA P. Low Oxygen Signaling and Tolerance in Plants [J]. Advances in Botanical Research, 2009, 50: 139—198.
- [7] HINZ M, WILSON I W, YANG J, et al. Arabidopsis RAP2. 2: an Ethylene Response Transcription Factor That is Important for Hypoxia Survival [J]. Plant Physiology, 2010, 153(2): 757—772.
- [8] HUQ E, HODGES T K. An Anaerobically Inducible Early (Aie) Gene Family from Rice [J]. Plant Molecular Biology, 1999, 40(4): 591—601.
- [9] 吴功庆. 淹水胁迫下薏苡乙醇脱氢酶(ADH1)和丙酮酸脱羧酶(PDC1)基因 cDNA 片段的克隆及其表达的初步分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2006.
- [10] HOEREN F U, DOLFERUS R, WU Y, et al. Evidence for a Role for AtMYB2 in the Induction of the Arabidopsis Alcohol Dehydrogenase Gene (ADH1) by Low Oxygen [J]. Genetics, 1998, 149(2): 479—490.
- [11] ABE H, URAO T, ITO T, et al. Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) Function as Transcriptional Activators in Abscissic Acid Signaling [J]. Plant Cell, 2003, 15(1): 63—78.
- [12] PAPDI C, ÁBRAHÁM E, JOSEPH M P, et al. Functional Identification of Arabidopsis Stress Regulatory Genes Using the Controlled cDNA Overexpression System [J]. Plant Physiology, 2008, 147(2): 528—542.
- [13] CHRISTIANSON J A, WILSON I W, LLEWELLYN D J, et al. The Low-Oxygen-Induced NAC Domain Transcription Factor ANAC102 Affects Viability of Arabidopsis Seeds Following Low-Oxygen Treatment [J]. Plant Physiology, 2009, 149(4): 1724—1738.
- [14] GRACEY A Y, TROLL J V, SOMERO G N. Hypoxia-Induced Gene Expression Profiling in the Euryoxic Fish *Gillichthys mirabilis* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001, 98(4): 1993—1998.
- [15] 杨雪莲. 乙烯诱导伏令夏橙果实脱落过程中重要功能基因的克隆、表达与功能分析[D]. 重庆: 西南大学, 2010.
- [16] SUN W, CAO Z, LI Y, et al. A Simple and Effective Method for Protein Subcellular Localization Using Agrobacterium-Mediated Transformation of Onion Epidermal Cells [J]. Biologia, 2007, 62(5): 529—532.
- [17] STEARNS JR E M, MORTON W T. Incorporation of Acetate Into Fatty Acids and Complex Lipids of Soybean Cotyledon Slices Under Aerobic and Anaerobic Conditions [J]. Lipids, 1973, 8(12): 668—674.
- [18] FUKAO T, BAILEY-SERRES J. Plant Responses to Hypoxia is Survival a Balancing Act? [J]. Trends in Plant Science, 2004, 9(9): 449—456.
- [19] GEISLER-LEE J, CALDWELL C, GALLIE D R. Expression of the Ethylene Biosynthetic Machinery in Maize Roots is

Regulated in Response to Hypoxia [J]. Journal of Experimental Botany, 2010, 61(3): 857—871.

[20] STEFFENS B, SAUTER M. Role of Ethylene and Other Plant Hormones in Orchestrating the Responses to Low Oxygen Conditions [M]//Low-Oxygen Stress in Plants. Vienna: Springer Vienna, 2014: 117—132.

[21] BAILEY-SERRES J, FUKAO T, GIBBS D J, et al. Making Sense of Low Oxygen Sensing [J]. Trends in Plant Science, 2012, 17(3): 129—138.

[22] KAMALUDDIN M, ZWIAZEK J J. Ethylene Enhances Water Transport in Hypoxic Aspen [J]. Plant Physiology, 2002, 128(3): 962—969.

[23] MUHAMMAD A A. Waterlogging Stress in Plants: A Review [J]. African Journal of Agricultural Research, 2012, 7(13): 1976—1981.

Cloning, Subcellular Localization and Expression Analysis of *CsHRP* Gene from *Citrus*

CHEN Jiao^{1,2,3}, MA Yan-yan³, ZHANG Jun³, YANG Xue-lian²,
ZHONG Guang-yan⁴, ZHU Shi-ping³, LU Zhi-ming²

1. Cash Crop Station of Agriculture and Animal Husbandry Bureau of Fushun County, Fushun Sichuan 643200, China;
2. School of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400715, China;
3. Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Science, Chongqing 400712, China;
4. Institute of Fruit Tree Research, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China

Abstract: A hypoxia responsive gene, *CsHRP*, was cloned from the fruit abscission zone of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) cv. Olinda] using RT-PCR and RACE. According to sequence analysis, *CsHRP* encoded a protein of 98 amino acid residues. Alignment of *CsHRP* genomic DNA sequences with cDNA showed that the gene contained two introns. BLASTp analysis showed that *CsHRP* protein contained a conserved hypoxia induced protein conserved region HIG_1_N, and shared 68%—81% amino acid identities with its homologous proteins from *Theobroma cacao*, *Zea mays*, *Hevea brasiliensis* and other species. Subcellular localization revealed that *CsHRP* protein was localized in cell wall/cell membrane. Quantitative real-time PCR results showed that the expression of *CsHRP* was higher in cotyledons than in leaves, stems and roots. Under adverse conditions, *CsHRP* was induced by cold, salinity, PEG6000, abscisic acid (ABA), ethylene (ET), methyl jasmonic acid (MeJA) and salicylic acid (SA), suggesting that this gene may respond to multiple signal transductions.

Key words: *Citrus*; hypoxia-responsive gene; gene expression

责任编辑 周仁惠

